低频超声联合造影剂微泡对前列腺组织中头孢呋辛浓度的影响

尚永刚[1],韩广玮[1],董小小[2],崔 栋[1],刘城城[1],易善红[1] (1. 第三军医大学新桥医院泌尿外科,重庆 400037;2. 第三军医大学新桥医院超声诊断科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 观察微泡介导下低频超声辐照对大鼠前列腺组织中药物浓度的影响。**方法** 选取健康成年雄性 SD 大鼠 20 只,随机平均分为实验组(超声微泡 + 头孢呋辛组)及对照组(头孢呋辛组)。实验组经尾静脉注射头孢呋辛及微泡后立即以低频超声辐照前列腺 5 min;对照组经尾静脉注射头孢呋辛及与实验组微泡等量的生理盐水后立即对前列腺进行超声假照 5 min。辐照结束后取出前列腺,进行组织匀浆,高效液相色谱仪测定前列腺组织中头孢呋辛含量。**结果** 实验组与对照组单位质量前列腺组织中头孢呋辛浓度分别为(16.274 ±9.515) μg/mg、(8.336 ±6.743) μg/mg,实验组单位质量前列腺组织中头孢呋辛浓度明显高于对照组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 低频超声联合造影剂微泡可显著提高大鼠前列腺组织的通透性,从而提高前列腺组织中的药物浓度。

[关键词] 慢性前列腺炎;微泡;超声辐照;头孢呋辛

[中图分类号] R697.33; R781.42 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)06-0602-04

Effect of low-dose ultrasound-mediated microbubble on the concentration of cefuroxime in rat prostate

SHANG Yong-gang[1], HAN Guang-wei[1], DONG Xiao-xiao[2], CUI Dong[1], LIU Cheng-cheng[1], YI Shan-hong[1] (1. Department of Urology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Department of Ultrasonography, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To study the effect of ultrasound-mediated microbubble on the concentration of cefuroxime in rat prostate. **Methods** Twenty male SD rats were randomly divided into the experimental group (ultrasound-mediated microbubble + cefuroxime group) and the control group (cefuroxime group). The experimental group was given cefuroxime and microbubble via the tail vein, and then the prostates were exposed to ultrasonic irradiation for five minutes. The control group was given cefuroxime and the same amount of normal salin via the tail vein, and then given sham ultrasonic irradiation for five minutes. After the prostate was taken, cefuroxime concentration in prostate was measured by high performance liquid chromatograph. **Results** Concentration of cefuroxime in the experimental and the control group were (16.274 ±9.515) μg/mg and (8.336 ±6.743) μg/mg respectively. Compared to the control group, the concentration of cefuroxime was significant higher in the experimental group, and the difference is statistically significant ($P<0.05$). **Conclusion** Low-dose ultrasound-mediated microbubble can significantly improve the permeability of rat prostate tissue, thereby enhancing the drug concentration in prostate tissue.

Keywords: chronic prostatitis; microbubbles; ultrasonic irradiation; cefuroxime

慢性前列腺炎是最常见的前列腺疾病[1],流行病学调查显示,约 30% ~40% 的中青年男性患有此病[2]。临床上多以尿路刺激征、会阴部及下腰部疼痛不适等为主要表现[3],并多伴有焦虑、抑郁等精神症状[4],严重危害着患者的身心健康。临床上有多种方法治疗慢性前列腺炎,但效果欠佳,治疗后容易复发[5]。近年来的研究表明,"血 - 前列腺屏障"的存在是限制慢性前列腺炎治疗效果的重要因素[6],如何开放"血 - 前列腺屏障",提高前列腺组织的通透性是近年来研究的热点。在前期的研究中,我们观察到微泡介导下低频超声辐照可以显著提高动物前列腺组织的通透性[7],该方法可能成为治疗慢性前列腺炎的一种新方法。但是,超声微泡作用是否能提高前列腺组织中的药物浓度,尚未明确。因此,我们通过实验观察微泡介导下低频超声辐照对前列腺组织中药物浓度的影响,以寻求治疗慢性前列腺炎的新方法。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

头孢呋辛钠标准品 0.5 g(中国药品生物制品检定所);注射用头孢呋辛钠粉针 0.75 mg(意大利 EssetiFarmaceuticis. r. l);造影剂微泡(脂氟显,第三军医大学附属新桥医院超声科自行研制);0.9% 氯化钠注射液 500 mL(四川科伦药业公司);15% 三氯乙酸(成都市科隆化工试剂公司);3% 戊巴比妥钠(国药集

doi:10.11659/jjssx.02E015004

[基金项目] 第三军医大学新桥医院临床科研基金(2014YLC27)

[通讯作者] 易善红,E-mail:yshh8810@sina.com

[收稿日期] 2015-04-28 [修回日期] 2015-06-15

团化学试剂有限公司)。

1.2　实验仪器

低功率超声治疗仪(第三军医大学附属新桥医院超声科自行研制);美国 Waters 高效液相色谱仪;高速离心机(贝克曼 Allegra 64R)。

1.3　实验方法

1.3.1　实验动物分组　　选取 200 ~ 300 mg 的成年雄性 SD 大鼠 20 只(购自第三军医大学大坪医院实验动物中心),采用抽签法随机分为实验组(超声微泡 + 头孢呋辛组)及对照组(头孢呋辛组),每组 10 只。

1.3.2　标本收集　　在实验组中,沿下腹部正中切口暴露前列腺后将配置好的头孢呋辛钠溶液(60 mg/kg)与造影剂微泡(0.1 mL/kg)经尾静脉同时注入大鼠体内,随后立即给予超声治疗仪持续辐照前列腺 5 min(频率 1.0 MHz,声压 250 kPa,占空比 1%,声压 0.023 W/cm^2)。同样方法暴露对照组大鼠前列腺,经尾静脉同时注射头孢呋辛钠溶液(60 mg/kg)与生理盐水(0.1 mL/kg),随后给予超声假照 5 min(不发射超声波)。辐照结束后立即取出前列腺组织,置于 -80 ℃冰箱中保存待用。

1.3.3　样品的制备　　将前列腺组织置于室温下避光解冻,用生理盐水漂洗前列腺,洗净前列腺组织表面淤血,吸水纸吸干后准确称取其质量,放置于试管中,剪碎,加入生理盐水 2 mL,制成组织匀浆。漩涡混匀 30 s 后置于 10 000 r/min 离心机中离心 5 min,取上清,加入 15% 三氯乙酸 0.4 mL 沉淀蛋白后再次离心 5 min,取上清液 0.4 mL 待测。

1.3.4　标准液的制备　　精密称取头孢呋辛标准品 50 mg 置于 50 mL 容量瓶中,加入超纯水 50 mL 定容,即制备成 1 mg/mL 的标准液。

1.3.5　色谱条件　　色谱柱:Diamonsil C_{18}(150 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:酸钠缓冲液 - 乙腈(75 ∶ 25);pH:3.9;流速:1 mL/min;进液量:10 μl;检测波长:272 nm。

1.3.6　色谱行为　　取空白前列腺组织,按 1.3.3 中方法制备前列腺组织上清液,取上清液 0.4 mL,进样 10 μl,得到空白前列腺组织上清液色谱图;取 1 mg/mL 头孢呋辛标准液0.4 mL,进样 10 μl,得到头孢呋辛标准品色谱图;将 1 mg/mL 头孢呋辛标准液与空白前列腺组织上清液均匀的混合,取 10 μl 进样,得到头孢呋辛标准及前列腺上清液混合物色谱图。

1.3.7　标准曲线的绘制　　依次将配置好的头孢呋辛标准液稀释为 0.5 μg/mL、1 μg/mL、5 μg/mL、10 μg/mL 及 50 μg/mL 的溶液,按前列腺样品液处理方法处理后进样。记录各质量浓度下的色谱峰面积,以 X 轴为质量浓度,Y 轴为峰面积做图,即可得到头孢呋辛标准曲线。

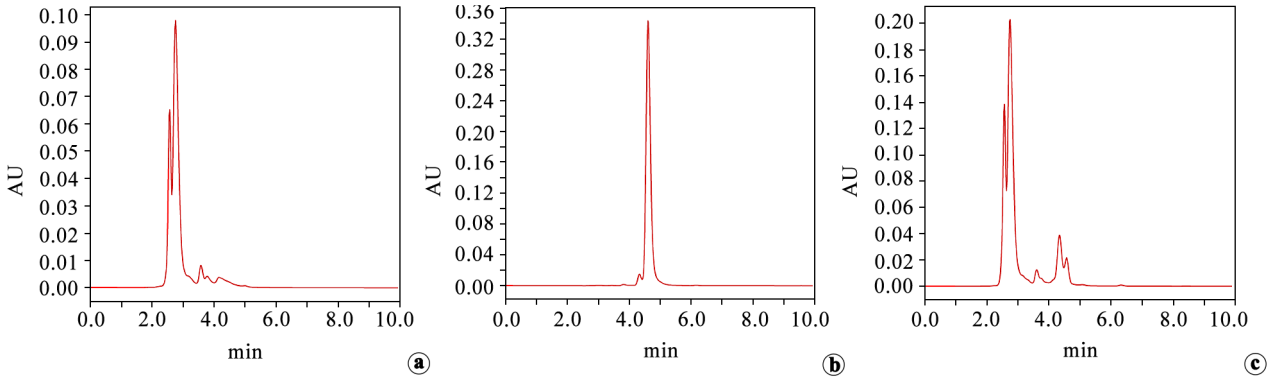
1.4　统计学分析

数据采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 12.0 软件对数据进行 t 检验,$P < 0.05$ 为组间差异有统计学意义。

2　结果

2.1　色谱行为

空白前列腺组织上清液色谱图、头孢呋辛标准品色谱图和头孢呋辛标准品和前列腺上清液混合物色谱图见图 1。由图可见,前列腺组织上清液及头孢呋辛标准品的保留时间分别约为 2.9 min、4.5 min,头孢呋辛色谱峰与前列腺组织杂质色谱峰完全分离,前列腺组织上清液内杂质对头孢呋辛样品定量测定干扰较小。



a:空白前列腺组织上清液色谱图;b:头孢呋辛标准品色谱图;c:头孢呋辛标准及前列腺上清液混合物色谱图

图 1　头孢呋辛标准品与空白前列腺的 HPLC 色谱图

2.2　标准曲线

以测得的各质量浓度头孢呋辛标准液色谱峰面积为纵轴,以标准液质量浓度为横轴,得到头孢呋辛标准曲线(图 2)。外标法定量,采用加权最小二乘法进行回归计算。求得直线回归方程为:$y = 33\ 066x - 2\ 515.9$($R^2 = 0.999$, $n = 5$)。

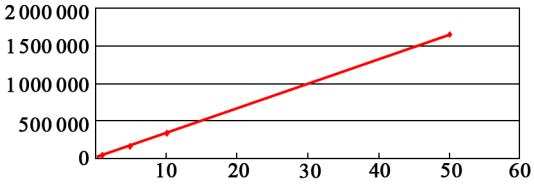


图 2　头孢呋辛标准曲线

2.3 前列腺组织中头孢呋辛质量浓度测定

以高效液相色谱仪检测各样品中头孢呋辛含量,并根据样品处理前前列腺质量计算单位质量前列腺组织中所含头孢呋辛质量浓度。实验组及对照组单位质量前列腺组织中所含头孢呋辛质量浓度分别为(16.274 ± 9.515) μg/mg、(8.336 ± 6.743) μg/mg,与对照组比较,实验组中单位质量前列腺组织中所含头孢呋辛质量浓度明显升高($P<0.05$),见表 1。

表 1 超声微泡作用后前列腺组织中头孢呋辛质量浓度比较(μg/mg)

组别	样品标号										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	均值
实验组	11.472	22.809	35.161	12.867	27.102	8.147	16.403	16.000	7.415	5.369	16.274 ± 9.515 *
对照组	2.685	5.039	7.523	19.709	3.795	21.891	6.347	6.879	4.403	5.091	8.336 ± 6.743

*:与对照组比较,$P<0.05$

3 讨论

血 - 脑屏障、血 - 睾屏障目前已经通过许多实验得到了证实,而在男性泌尿生殖系统中是否也存在着相似的屏障结构呢? Motrich 等[8]通过实验证实在自身免疫性前列腺炎大鼠中,精子的损害发生在精子和前列腺液混合过程中,因此,学者们认为在前列腺组织中可能也存在一个与血 - 脑屏障、血 - 睾屏障相似的"屏障"结构,并具有阻止炎症发生和炎细胞迁移、保护精子免受损害的作用[9]。血 - 脑屏障限制水溶性以及大分子脂溶性物质进入脑内,起到了维持大脑内环境稳定的作用,但妨碍了大分子药物进入脑内,使脑部疾病药物治疗较为困难[10]。血 - 前列腺屏障有可能也存在相似的功能,限制药物进入前列腺组织。另外,前列腺组织发生慢性炎症时,导致前列腺组织发生病理改变,纤维组织增生、基底膜增厚、细胞间紧密连接更加致密加强等原因,进一步加强了这种"屏障"作用[11]。由此可以推测,进入血液的药物成分就可能受到血 - 前列腺屏障的限制而只有少量能到达前列腺组织内发挥作用,这正好解释了为什么大多数抗菌药物在前列腺液中浓度比较低[12],以至于不能最大限度发挥药物疗效。因此,如何开放血 - 前列腺屏障成为近年来实验研究和临床治疗慢性前列腺炎的热点话题。

造影剂微泡作为一种新型的声学造影剂,既可以增强超声显像,又可以介导低频超声辐照提高局部组织的通透性,使药物在局部达到较高浓度[13]。其原理主要是在微泡介导下超声波通过其空化效应,使微血管及细胞生物膜受损,增加血管内皮细胞之间以及生物膜间的空隙,促进血液内成分溢出血管并通过生物膜到达治疗部位,总的来说,就是增加了生物屏障的通透性[14]。微泡介导下低频超声辐照开放血 - 脑屏障(或血 - 肿瘤屏障)并靶向释放药物及基因治疗神经系统疾病的研究应用较多[15-16],已经证明有很好的临床应用价值。

在前期实验中,本课题组成员观察到经微泡介导下的低频超声辐照能显著提高渗入到动物前列腺组织中的伊文思蓝浓度,提示微泡介导下低频超声辐照提高了前列腺组织的通透性,此方法可能成为治疗慢性前列腺炎的一种新方法[7]。而本研究更直观地显示,微泡介导下低频超声辐照显著提高了动物前列腺组织中的头孢呋辛浓度,再次证实超声微泡可以显著提高前列腺组织通透性的事实,为后期超声微泡在治疗慢性前列腺炎中的应用进一步奠定了理论基础。

虽然微泡介导下低频超声辐照能显著提高前列腺组织中的药物浓度,但其具体机制仍不明确。前期研究通过透射电镜观察到经超声微泡作用后前列腺组织中毛细血管内皮细胞间的紧密连接遭到破坏,表明超声微泡作用可能通过开放紧密连接来提高前列腺组织的通透性[7],目前关于这方面的研究较少,有进一步研究的价值。

[参考文献]

[1] Li T, Liu G, Li J, et al. Mechanisms of prostate permeability triggered by microbubble-mediated acoustic cavitation[J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 64(2): 147 - 153.

[2] Khaikova A, Sohar S, Kazlouskaya V. P3-S1.05 Incidence of STI in patients with chronic prostatitis[J]. Sex Transm Infect, 2011, 87(1): A268.

[3] Battikhi MN, Ismail H, Battikhi Q. Effects of chronic bacterial prostatitis on prostate specific antigen levels total and free in patients with benign prostatic hyperplasia and prostate cancer[J]. Int Urol Nephrol, 2006, 38(1): 21 - 26.

[4] Chung SD, Huang CC, Lin HC. Chronic prostatitis and depressive disorder: a three year population-based study[J]. J Affect Disord, 2011, 134(3): 404 - 409.

[5] Shang Y, Cui D, Yi S. Opening tight junctions may be key to opening the blood- prostate barrier[J]. Med Sci Monit, 2014, 20(1): 2504 - 2507.

[6] Fulmer BR, Turner TT. A blood-prostate barrier restricts cell and molecular movement across the rat ventral prostate epithelium[J]. J Urol, 2000, 163(5): 1591 - 1594.

[7] Liu Y, Yi S, Zhang J, et al. Effect of microbubble-enhanced ultrasound on prostate permeability: a potential therapeutic method for prostate

不同预处理方法对成年大鼠心肌保护效果的对比研究

唐文帅[1,2],廖 丽[2],赵树林[2],廖祥丽[2],钟前进[2],胡义杰[2],许红霞[1] (1. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所营养科,重庆 400042;2. 第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管外科,重庆 400042)

[摘 要] **目的** 探讨不同预处理方法对缺血再灌注损伤大鼠心肌保护的效果及其可能机制。**方法** 建立 Langendorff 离体心脏灌注模型,20 只 SD 成年大鼠根据预处理方式分为对照组、缺血预处理组、AG490 预处理组和 Rapamycin 预处理组,每组 5 只。比较各预处理组左心室发展压(LVDP)、等容收缩期左心室内压上升最大变化速率(Max Dp/dt)、等容舒张期左心室内压下降最大变化速率(Min Dp/dt)等心脏功能参数和心肌组织损伤情况,检测 STAT3 及其磷酸化水平、自噬相关蛋白 LC3 和 LAMP2 蛋白表达水平。**结果** 缺血预处理组、AG490 预处理组、Rapamycin 预处理组的 LVDP、Max Dp/dt、Min Dp/dt 均显著优于对照组。AG490 预处理组与 Rapamycin 预处理组之间在 Max Dp/dt 和 Min Dp/dt 上有差异,但 AG490 预处理组与缺血预处理、Rapamycin 预处理与缺血预处理之间无显著差异。缺血预处理组、AG490 预处理组和 Rapamycin 预处理组心肌组织凋亡水平均低于对照组,但 3 组间差异无统计学意义。缺血预处理组 STAT3 水平最高,AG490 组和 Rapamycin 组其次,但均高于对照组水平;AG490 组 P-STAT3 水平明显低于缺血预处理组和 Rapamycin 预处理组,接近对照组。Rapamycin 组 LC3 水平最高,缺血预处理组和 AG490 组接近,但均显著高于对照组。而代表心肌自噬溶酶体功能的 LAMP2 水平,在缺血预处理组最强,Rapamycin 预处理和 AG490 预处理组其次,但均显著高于对照组。**结论** AG490 预处理对成年大鼠心肌保护效果与缺血预处理、Rapamycin 预处理相当,其机制可能并非通过经典的 JAK/STAT 信号作用途径实现,而可能与其诱导的保护性自噬相关。

[关键词] 心肌缺血再灌注损伤;缺血预处理;JAK/STAT;自噬
[中图分类号] R654.1 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2015)06-0605-04

Comparison of cardioprotection effects between varied preconditioning methods on myocardial ischemia/reperfusion injury

TANG Wen-shuai[1], LIAO Li[1], ZHAO Shu-lin[1], LIAO Xiang-li[1], ZHONG Qian-jin[1], HU Yi-jie[1], XU Hong-xia[2] (1. Department of Cardiovascular Surgery, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China; 2. Department of Nutrition, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To compare cardioprotection effects between varied preconditioning methods on myocardial ischemia/reperfusion injury. **Methods** Twenty adult SD rats were divided into 4 groups: ischemia preconditioning group, AG490 preconditioning group, Rapamycin

doi:10.11659/jjssx.08E015141
[基金项目] 国家自然科学基金(81200182)
[通讯作者] 许红霞,E-mail:hongxiaxu@tmmu.edu.cn;胡义杰,E-mail:cts_hu@163.com
[收稿日期] 2015-08-14 [修回日期] 2015-08-28

disease[J]. Urology, 2013, 81(4): e1-7.
[8] Motrich RD, Maccioni M, Ponce AA, et al. Pathogenic consequences in semen quality of an autoimmune response against the prostate gland: from animal models to human disease[J]. J Immunol, 2006, 177(2): 957-967.
[9] Ghabriel MN, Lu JJ, Hermanis G, et al. Expression of a blood brain barrier specific antigen in the reproductive tract of the male rat[J]. Reproduction, 2002, 123(3): 389-397.
[10] 侯进义,沈 霞,孙菊光. 雌激素对大鼠脑缺血再灌注后血脑屏障作用研究[J]. 局解手术学杂志, 2014, 23(3): 224-228.
[11] Liu Y, Liu Z, Li T, et al. Ultrasonic sonoporation can enhance the prostate permeability[J]. Med Hypotheses, 2010, 74(3): 449-451.
[12] 顾方六. 现代前列腺病学[M]. 北京:人民军医出版社, 2002: 521.
[13] Jackson JK, Pirmoradi FN, Wan CP, et al. Increased accumulation of paclitaxel and doxorubicin in proliferating capillary cells and prostate cancer cells following ultrasound exposure[J]. Ultrasonics, 2011, 51(8): 932-939.
[14] Skyba DM, Price RJ, Linka AZ, et al. Direct in vivo visualization of intravascular destruction of microbubbles by ultrasound and its local effects on tissue[J]. Circulation, 1998, 98(4): 290-293.
[15] Xie F, Boska MD, Lof J, et al. Effects of transcranial ultrasound and intravenous microbubbles on blood brain barrier permeability in a large animal model[J]. Ultrasound Med Biol, 2008, 34(12): 2028-2034.
[16] 崔 海,李佩谅,李 露,等. 诊断超声联合微泡靶向开放单侧大鼠血脑屏障的初步研究[J]. 临床超声医学杂志, 2013, 15(11): 737-740.

(编辑:魏 源)